

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	磯江 つばさ
学位論文題目			
Role of HIF-1 α in development of diabetic nephropathy (糖尿病性腎症発症、進展におけるHIFの役割)			
共著者名			
牧野 雄一、坂上 英充、藤田 征弘、本庄 潤、滝山 由美、伊藤 博史、羽田 勝計			
未公開			
研究目的			
<p>糖尿病性腎症は、末期腎不全を来す疾患として、我が国における透析療法導入の原疾患第一位となった後も増加しつつあり、その発症進展阻止法の開発は社会的急務である。糖代謝異常、腎臓内血行動態の変化を背景に発生する腎細小血管障害が本態と考えられており、病理学的には糸球体における細胞外基質産生の増加によるメサンギウム領域の拡大を特徴とする。メサンギウム細胞の形質ならびに機能変化には高血糖に起因する種々の細胞内情報伝達系路の活性化が関与することが示されているが、いまだに不明な点も多い。</p> <p>低酸素で活性化される低酸素誘導性転写因子Hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)は、生体の低酸素応答に関わる遺伝子群の発現を転写のレベルで制御する。近年、正常酸素環境下においても、サイトカイン、血管作動性因子、各種代謝産物などによりHIF-1αが活性化されることが明らかにされつつあり、低酸素応答のみならず、広く細胞代謝・機能制御におけるHIF-1αの役割が注目されている。</p> <p>我々は、HIF-1αが、解糖系酵素、糖輸送蛋白質、細胞増殖因子など糖尿病性腎症の発症・進展に密接に関連する分子群の産生制御の鍵分子であることに着目し、糖尿病性糸球体病変の成立・進展におけるHIF-1αの役割を明らかにすることを目的とした。</p>			
材料・方法			
<p>培養ヒトメサンギウム細胞(hMC)、マウスメサンギウム細胞(mMC)を、正常濃度(100 mg/dl)グルコース培地(NG)、高濃度(450 mg/dl)グルコース培地(HG)、高浸透圧(グルコース 100 mg/dl + Lグルコース 350 mg/dl)培地(NGO)にて培養後、細胞抽出液を調整した。対照にはヒト近位尿細管上皮細胞(RPTEC)およびHeLa細胞を用いた。HIF-1αおよびCarbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP)蛋白質発現はウエスタンブロット法、HIF-1αおよびHIF-1標的遺伝子発現はリアルタイムPCR法にて検討した。HIF-1α遺伝子プロモーター活性はルシフェラーゼ法を用いて検討した。</p> <p>糖尿病モデルマウスの腎糸球体における、HIF-1α発現の免疫組織学的検討には、Streptozotocin (STZ)投与後24週の糖尿病マウスおよび18週齢の遺伝性肥満・糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)より摘出した腎臓標本を用いた。</p>			

成 績

- 1) NG 培養下 hMC において、HIF-1 α 蛋白質の低酸素誘導性発現を認めた。
- 2) HG 培養下の hMC においては、正常酸素濃度条件下でも HIF-1 α 蛋白質の発現が誘導された。同条件下の HeLa 細胞および RPTEC、或は NGO 培養下 hMC では HIF-1 α 蛋白質の発現に変化はなく、かかる HIF-1 α 蛋白質発現の誘導は HG 下の hMC に特異的である事が示された。
- 3) 正常酸素濃度下 HG 培養 hMC、mMC において、にて HIF-1 標的遺伝子の発現が増加した。RNA 干渉法により HIF-1 α 蛋白質の発現を抑制した細胞においては、HG 培養による HIF-1 標的遺伝子発現増強が是正された。
- 4) HG 培養下 mMC における HIF-1 α 発現増強には、グルコース応答性転写因子 ChREBP を介した HIF-1 α 遺伝子プロモーターの活性化が関与する可能性が示された。RNA 干渉法による ChREBP の発現抑制により、HG 培養下 mMC における HIF-1 α 蛋白質および HIF-1 標的遺伝子の発現増強が消失した。
- 5) 糖尿病モデルマウスの腎糸球体において、HIF-1 α 蛋白質発現細胞が対照群に比べて有意に増加していた。HIF-1 α 蛋白質発現細胞の一部は α -smooth muscle actinin(α -SMA)陽性細胞と共局在したことから、MC であることが示唆された。他方、Wilms' tumor 1(WT1)抗原陽性細胞との共局在も認められ、HIF-1 α が糸球体上皮細胞にも発現している事が示された。

考 案

近年、HIF-1 α の発現が種々の腎疾患の病態に関与する事が示されている。多くは、腎間質尿細管での発現であり、腎組織障害に伴う血管床の減少、間質の線維化などによる局所の慢性虚血／低酸素に対して HIF-1 が防御因子としての役割を担っている事が推察されている。我々は、高グルコースが MC に作用し、正常酸素濃度環境においても HIF-1 α の発現を誘導することを明らかにした。正常酸素濃度下における HIF-1 の役割は不明であるが、本研究において、高グルコースにより誘導された HIF-1 が、糖輸送蛋白、解糖系酵素、細胞成長因子や基質分解酵素抑制分子などの遺伝子発現を正に制御する事が示され、HIF-1 が MC における糖代謝異常、細胞機能障害や形質変化を促し、糖尿病性糸球体病変の形成に寄与する可能性が考えられた。

高グルコースによる HIF-1 α 発現増強のメカニズムとして、転写因子 ChREBP を介した HIF-1 α 遺伝子プロモーターの活性化が関与する可能性が示された。ChREBP はグルコースや炭水化物摂取により活性化される転写因子であり、糖過剰摂取時の糖代謝、脂肪合成などエネルギー貯蔵に関わる遺伝子群の発現を制御する。従来、ChREBP およびその標的遺伝子は肝臓に豊富に発現している事が知られていたが、腎臓における発現とその意義についてはほとんど解析されていない。本研究において、ChREBP は MC にも存在し、遺伝子発現制御に寄与する事が示された。ChREBP の発現抑制により、MC における高グルコース誘導性の HIF-1 α および HIF-1 α 標的遺伝子発現異常が是正される事が明らかとなり、ChREBP が、過剰糖による細胞・臓器障害にも密接に関わる可能性が示唆された。一方、尿細管細胞での ChREBP の発現レベルは、MC に比し極めて低く、高グルコースによる HIF-1 α 発現増強作用に細胞特異性を付与するメカニズムを考察する上で興味深い。

STZ 誘導糖尿病マウス、db/db 糖尿病モデルマウスより摘出した腎臓の免疫組織学的解析において、糸球体内 MC での HIF-1 α 発現の優位な増強を認め、高グルコースが *in vivo* でも同様に、MC における HIF-1 α 発現制御に関わる事が示唆された。一方、糸球体上皮細胞における HIF-1 α 発現増強も観察され、糖尿病／高血糖による腎糸球体制御に広く HIF-1 α が重要な役割を果たしている可能性が示された。糖尿病性糸球体傷害には、高グルコースによる直接作用に加え、糸球体高血圧、酸化ストレスなどの種々の物理化学的要因の関与も示されている。かかる因子による糸球体構成細胞における HIF-1 α 発現への影響の解

析は、*in vivo*でのHIF-1 α 発現制御機構ならびに病態生理学的意義の理解の進展に重要な示唆を与えると考えられる。

MCにおけるHIF-1 α 発現抑制により、高グルコースによる遺伝子発現異常が是正された事は、糖尿病性糸球体病変の治療標的としてのHIF-1 α の有用性を示唆する。HIF-1 α 遺伝子欠損マウス、HIF-1 α 機能抑制分子高発現マウスにおける糖尿病モデル作成はかかる治療法開発において必須の解析であり、現在進行中である。

結 論

高グルコースによるHIF-1 α を介した遺伝子発現調節機構が糖尿病性腎症の成立ならびに進展にかかわる可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Haneda M, Koya D, Isono M, Kikkawa R. Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003 May; 14(5):1374-1382.
2. Déry MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Mar;37(3):535-540.
3. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med.* 2007 Dec;85(12):1325-1330.

参 考 論 文

1. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J. Biol. Chem.*, 2007 (19);14073-14082.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	磯 江 つばさ
<u>審査委員長 立 野 正 敏</u>			
<u>審査委員 長谷部 直 幸</u>			
<u>審査委員 羽 田 勝 計</u>			
学 位 論 文 題 目			
Role of HIF-1 α in development of diabetic nephropathy (糖尿病性腎症発症、進展における HIF の役割)			
<p>糖尿病性腎症は透析療法導入の原疾患第一位であり、発症進展阻止法の開発は社会的急務である。メサンギウム細胞は、糖尿病性糸球体病変の発症・進展の中心的役割を担い、高血糖に起因する多様な機能変化が報告されているが、未だ不明な点も多い。Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)は、生体の低酸素応答に関わる転写因子である。近年、酸素分圧非依存性に HIF-1 α が活性化することが報告され、広く生体機能制御における HIF-1 α の役割が注目されている。</p> <p>論文提出者らは、培養メサンギウム細胞、およびマウス糖尿病モデル腎組織を用いて HIF-1 α の発現および機能を解析し、糖尿病性糸球体病変の成立・進展における HIF-1 α の役割を考察したものである。</p> <p>論文提出者は、ヒトメサンギウム細胞培養株およびマウスメサンギウム細胞培養株を、高濃度グルコース培地(HG)にて培養後、HIF-1 α および Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP) 蛋白発現をウエスタンブロット法、HIF-1 α および HIF-1 標的遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。次に糖尿病モデルマウスの腎糸球体における、HIF-1 α 発現の免疫組織学的検討をおこない、以下の結果を得た。</p> <p>1) 高濃度グルコースは、正常酸素分圧下メサンギウム細胞において、HIF-1 α 蛋白およびその標</p>			

的遺伝子の発現を誘導する。2) 高濃度グルコースは、ChREBP を介して HIF-1 α mRNA 発現を増加させる。3) 糖尿病モデルマウスの腎糸球体において、HIF-1 α の発現が亢進している。以上の結果から、高濃度グルコースによる HIF-1 α を介した遺伝子発現調節機構が糖尿病性腎症の成立・進展にかかわる可能性が示唆された。本研究成果は、糖尿病性糸球体病変の発症・進展において、HIF-1 α が重要な転写因子であり、その抑制が糖尿病性腎症の新たな治療法になり得ることを明らかにした。今後の臨床応用にも発展する興味深い研究である。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。